

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 05 JUL 2004

WIPO PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

BEST AVAILABLE COPY

Aktenzeichen:

10 2004 005 784.2

Anmeldetag:

04. Februar 2004

Anmelder/Inhaber:

novosom AG, 06120 Halle/DE

Bezeichnung:

Injizierbare liposomale Depots mit initialer Freiset-
zung zum Peptid-Proteindelivery

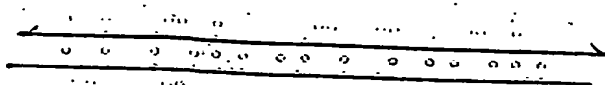
IPC:

A 61 K 9/127

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Juni 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon



Deutsche Patentanmeldung

5

**Injizierbare liposomale Depots mit initialer Freisetzung zum Peptid-
& Proteindelivery**

10

15

20

25

Zusammenfassung

30 Die Erfindung betrifft liposomale Formulierungen zur Herstellung eines injizierbaren Depots von Peptid- und Proteinwirkstoffen, das den Wirkstoff initial schnell freisetzt und dann eine langanhaltende Freisetzung und Wirkung in einem Säugerkörper aufweist.

Stand der Technik

Peptid- und Proteinwirkstoffe werden im Körper nach Applikation sehr schnell abgebaut oder ausgeschieden und müssen daher durch wiederholte Injektionen verabreicht werden. Um die „patient compliance“ zu erhöhen wird ein geeignetes „Deliverysystem“ (Abgabesystem) benötigt, das den Wirkstoff im Körper vor Abbau schützt und ihn nur langsam in die Blutbahn freigibt. Dazu werden Depotsysteme eingesetzt, die subkutan oder intramuskulär injiziert oder implantiert werden. Liposomen sind eine mögliche Form eines solchen Abgabesystemssystems. Sie sind aufgebaut aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten und umschliessen in ihrem Innern ein wässriges Kompartiment, in welches wasserlösliche Substanzen eingeschlossen werden können. In die Lipid-Doppelschicht können lipophile Substanzen eingebaut werden.

In J. Controll. Rel. 64 (2000) 155-166, in der US 5766627 und anderen Schriften der Autoren werden multivesikuläre Aggregate aus Liposomen als injizierbares Depotsystem für Insulin, Leuprolide und Enkephalin vorgestellt, die durch einen Doppelemulsionsprozess gewonnen werden. Wegen des Zusatzes unpolarer Triglyceride sind diese multizentrischen Aggregate nicht als Liposomen im engeren Sinne aufzufassen, da die Triglyceride keine Bilayermembranen bilden und nicht in solche eingebaut werden. Nachteilig ist weiterhin die Nutzung einer mit Wasser nicht mischbaren Ölphase zur Herstellung der Strukturen. Insbesondere beim Einschluss grösserer Proteine führt das zur Denaturierung an der Grenzfläche. Ebenso stellen Reste organischer Lösungsmittel ein nicht zu unterschätzendes regulatorisches Problem dar.

Für Depotsysteme finden nach dem Stand der Technik Liposomen Verwendung, die aus neutralen, anionischen oder PEG-Lipiden zusammengesetzt sind, etwa in der WO 9920301 für ein Depot von γ -Interferon, in Diabetes 31 (1982), 506-511 für ein Depot von Insulin; weiterhin in Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991), 10440-10444 zur Vakzinierung.

In BBA 1328 (1997), 261-272 werden verschiedene liposomale Systeme (unilamellar und multilamellar) aus Ei-PC, Ei-PG, DPPC, DPPG, PS und

Cholesterin auf deren Aufnahme ins Lymphsystem und der Bioverteilung nach subkutaner Gabe hin untersucht. Der Review-Artikel Advanced Drug Delivery Reviews 50 (2001), 143-156 schliesst an diese Untersuchungen an. Hier wird gezeigt, dass kleinere Liposomen (<150nm) aus einem subkutanen Depot in die Lymphe auswandern.

Nach dem Stand der Technik werden neutrale und negativ geladene Liposomen für liposomale Depotsysteme verwendet. Die Liposomen müssen eine Mindestgrösse aufweisen, um nicht in die Lymphe abzuwandern.

Die Herstellung grosser Liposomen von deutlich mehr als 150nm ist aber mit technischen und regulatorischen Schwierigkeiten verbunden. Insbesondere ist dann die wünschenswerte Sterilfiltration der Partikel nach deren Herstellung nicht mehr möglich.

Aufgabe der Erfindung war es nun, neue stabile liposomale Depotformulierungen bereitzustellen, die nach einer initialen schnellen Freisetzung, eine langanhaltende Freisetzung des Wirkstoffes über mindestens eine Woche erreichen und eine gute Verträglichkeit im Organismus aufweisen.

Zusammenfassung der Erfindung

Die Aufgabe wird gelöst durch die Formulierung der Wirkstoffe in Liposomen, die insbesondere bei der Anwendung als Depot in Form von Aggregaten vorliegen. Solche Liposomen umfassen in einer Ausführung der Erfindung neben neutralen Lipiden auch kationische Lipide.

Die Erfindung basiert auf der Beobachtung, dass positiv geladene Liposomen gut mit Komponenten des Serums oder der Interstitialflüssigkeit aggregieren und in diesem Zustand an der subkutanen oder intramuskulären Einstichstelle verbleiben müssen.

Ein Wegdiffundieren des Depots von der Einstichstelle wird damit vermieden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

In einer bevorzugten Ausführung der vorliegenden Erfindung werden Liposomen, die aus neutralen und kationischen Lipiden aufgebaut sind, als liposomales Depotsystem für die verzögerte Freisetzung von therapeutischen Peptiden und Proteinen verschiedenster Molmassen eingesetzt.

Der Review-Artikel J. Pharm. Sci. 89 (3), 2000, 297-310 gibt absolute Bioverfügbarkeiten verschieden großer Peptide und Proteine nach subkutaner Applikation an, wobei mit zunehmender Molmasse keine signifikante Verringerung der Bioverfügbarkeit beobachtet wird.

Da therapeutische Peptide und Proteine im Körper sehr schnell abgebaut werden, müssen diese durch wiederholte Injektionen verabreicht werden.

Die für diese Ausführung der Erfindung relevanten Peptide und Proteine, deren Analoga, zugehörige Peptide, Fragmente, Inhibitoren und Antagonisten umfassen:

Transforming growth factors (TGF-alpha, TGF-beta), Interleukine (z.B. IL-1, IL-2, IL-3), Interferone (IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma), Calcitonine, Insulin-like growth factors (IGF-1, IGF-2), Parathyroid hormone, Granulozyten-stimulierender Faktor (GCSF), Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor (GMCSF), Makrophagen stimulierender Faktor (MCSF), Erythropoetin, Amyline, Glucagone, Lipocortine, Wachstumshormone, Somatostatin, Angiostatin, Endostatin, Octreotid, Gonadotropin releasing hormone (GNRH), Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) und wirksame Agonisten wie Leuprolidacetat, Buserelin, Goserelin, Triptorelin; Platelet-derived growth factor; Blutgerinnungsfaktoren (z.B. Faktor VIII, Faktor IX), Thromboplastin-Aktivatoren, Gewebe Plasminogen Aktivatoren, Streptokinase, Vasopressin, Muramyl-dipeptide (MDP), Atrial natriuretic factor (ANF), Calcitonin gene-related Peptid (CGRP), Bombesin, Enkephaline, Enfuvirtide, Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor (FGF), Growth hormone releasing hormone (GRH), Bone morphogenetic proteins (BMP), Antikörper und Antikörperfragmente (z.B. scFv-Fragmente, Fab-Fragmente), Peptid T und Peptid T Amide,

6

Herpes Virus Inhibitor, Virus Replikations Inhibitions Faktor, Antigene und Antigenfragmente, lösliches CD4, ACTH und Fragmente, Angiotensine, und ACE Inhibitoren, Bradykinin (BK), Hypercalcemia malignancy factor (PTH like adenylate cyclase-stimulating protein), beta-casomorphins, chemotactic peptides and inhibitors, corticotropin releasing factor (CRF), caerulein, cholecystokinins + Fragmente, und Analoga, Galanin, gastric inhibitory polypeptide (GIP), gastrins, gastrin releasing peptide (GRP), motilin, PHI peptides, PHM peptides, peptide YY, secretins, melanocyte stimulating hormone (MSH), neuropeptide Y (NPY), neuromedins, neuropeptide K, neurotensins, phosphate acceptor peptide (c-AMP protein kinase substrates), Oxytocine, substance P, TRH - sowie Fragmente, Analoga und Derivate dieser Stoffe.

15

Neben Peptiden und Proteinen sind auch Kohlenhydrate wie z.B. Heparin für diese Erfindung geeignete Wirkstoffmoleküle.

20

Keine geeigneten Wirkstoffe im Sinne der Erfindung sind Membranproteine, die sich schlecht in den Innenraum von Liposomen einbringen lassen.

25

Weiter sind solche Wirkstoffe nicht geeignet, bei denen eine kurzzeitige hohe Wirkstoffkonzentration, wie dies bei der initialen Anflutung der Fall ist, zu toxischen Reaktionen im Körper führen kann. Ein Beispiel hierfür ist Insulin, dessen Überdosierung zu lebensbedrohlichen hypoglykämischen Zuständen führen kann.

30

Andere Beispiele, wie Leuprolidacetat oder Antikörper, zeigen jedoch, dass ein initiales, schnelles Anfluten des Wirkstoffes toxikologisch völlig unbedenklich sein kann.

35

Für die Herstellung der Liposomen werden nach dem Stand der Technik etablierte Verfahren, wie Extrusion durch Polycarbonat-Membranen, Ethanolinjektion oder Hochdruckhomogenisation verwendet.

Als Liposomenbildner kommen membranbildende und membranständige Lipide in Frage, wobei diese natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Hierzu zählen insbesondere Cholesterol und Derivate, Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine als neutrale Lipide. Besonders bevorzugt werden die vollständig gesättigten

Verbindungen dieser Klasse verwendet, wie beispielsweise die Dimyristoyl-, Dipalmitoyl- oder Distearoyl-derivate der Phosphatidylcholine und Phosphatidylethanolamine.

5 Kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung umfassen beispielsweise:

DAC-Chol 3- β -[N-(N,N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol

DC-Chol 3- β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol

TC-Chol 3- β -[N-(N',N', N'-trimethylaminoethane) carbamoyl]

10 cholesterol

BGSC Bis-guanidinium-spermidine-cholesterol

BGTC Bis-guanidinium-tren-cholesterol,

DOTAP (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid

DOSPER (1,3-dioleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid).

15 DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid).
(Lipofectin®)

DORIE (1,2-dioleoyloxypropyl)-3 dimethylhydroxyethyl ammoniumbromid)

DOSC (1,2-dioleoyl-3-succinyl-sn-glycerol cholinester).

20 DOGSDSO (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-succinyl-2hydroxyethyl disulfide
ornithin),

DDAB Dimethyldioctadecylammonium bromid

DOGS ((C18)₂GlySper3⁺) N,N-dioctadecylamido-glycyl-spermin
(Transfectam®)

(C18)₂Gly⁺ N,N-dioctadecylamido-glycin

DOEPC 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin oder andere O-
Alkyl-Phosphatidylcholin oder-ethanolamine,

sowie von allen genannten Lipiden mit ungesättigten Fettsäure-
und/oder Fettalkoholketten deren gesättigte Derivate mit
30 Dimyristoyl-, Dipalmitoyl-, oder Distearoylketten.

Bevorzugte kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung umfassen
Cholesteryl 3 β -N-(Dimethyl-aminoethyl)carbamate (DC-Chol), 3- β -[N-
35 (N,N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol (DAC-Chol), (N-[1-
(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium Salz (DOTAP).

4
In einer bevorzugten Zusammensetzung werden gesättigte synthetische Phosphatidylcholone, wie DMPC, DPPC oder DSPC, Cholesterol, die kationischen Lipide DC-Chol, DAC-Chol oder DOTAP verwendet, wobei ganz besonders bevorzugt der Anteil der kationischen Lipide zwischen 5 und 20mol% beträgt und der Anteil aller sterolbasierten Lipide zwischen 35 und 60% beträgt.

Die Größe der Liposomen variiert von 20-1000 nm, bevorzugt von 50-800 nm und ganz besonders bevorzugt von 50-300 nm.

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Abgabesysteme. Zum Einschluss des gewünschten Wirkstoffes in die Liposomen wird dieser in einer Pufferlösung gelöst, mit welcher dann die Liposomen hergestellt werden. Der Einschluss kann passiv oder mittels des Advanced Loading Verfahrens erfolgen. Während das passive Einschliessen von Molekülen in Liposomen dem Fachmann bekannt ist, ist das Advanced Loading Verfahren in WO 01/34115 A2 beschrieben, deren Offenbarungsgehalt an dieser Stelle mitaufgenommen wird.

Der passive Einschluss wird bevorzugt dann verwendet, wenn große Mengen eines gut löslichen Wirkstoffes eingeschlossen werden sollen. Dafür werden Liposomen mit einer Lipidkonzentration von 30 bis 150 mM, bevorzugt mit einer Lipidkonzentration von 50 bis 120 mM und ganz besonders bevorzugt mit einer Lipidkonzentration von 80 bis 110 mM in Gegenwart des gelösten Wirkstoffes hergestellt. Die Einschlusseffizienz wird beim passiven Einschluss mit zunehmender Lipidkonzentration gesteigert, da das von der Lipid-Doppelschicht umschlossene Flüssigkeitsvolumen zunimmt.

Um hohe Einschlusseffizienzen zu erzielen, wird der Wirkstoff in einer weiteren Ausführung der Erfindung mittels des Advanced Loading Verfahrens in die Liposomen eingeschlossen. Dieses Verfahren wird bevorzugt dann angewendet, wenn der Wirkstoff möglichst effizient und damit z.B. kostensparend in die Liposomen eingeschlossen werden soll. Bei diesem Verfahren, das auf eine Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und membranbildenden Substanzen beruht, wird bei niedrigen Ionenstärken und bei einem pH-Wert gearbeitet, bei welchem der Peptid- oder Proteinwirkstoff in einem anionischen Ladungszustand

vorliegt. Für viele Proteine oder Peptide ist das unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei einem pH-Wert zwischen 7 und 8 der Fall. Die Ladung der Wirkstoffe bei einem gegebenen pH kann aus Datenbanken entnommen werden, etwa der SWISS-PROT oder lässt sich nach bekannten Algorithmen berechnen.

In einer weiteren Ausführung der Erfindung wird das passive Einschlussverfahren mit dem Advanced Loading Prozess kombiniert. Bei diesem Verfahren wird der Advanced Loading Prozess mit einer Lipidkonzentration von 30 bis 150 mM, bevorzugt mit einer Lipidkonzentration von 50 bis 120 mM und ganz besonders bevorzugt mit einer Lipidkonzentration von 80 bis 110 mM durchgeführt, um die Einschlussraten gegenüber den einzelnen Verfahren signifikant zu erhöhen.

Nach der Liposomenpräparation mittels des Advanced Loadings oder des kombinierten Verfahrens wird aussen an der Liposomenmembran anhaftender Wirkstoff von der Oberfläche der Liposomen entfernt. Das geschieht durch eine Auflösung der bestehenden Wechselwirkung beispielsweise durch Änderung des pH-Wertes oder Erhöhung der Ionenstärke.

Der freie Wirkstoff verbleibt ganz oder teilweise, aber zu mehr 10% in der Liposomensuspension und sorgt für das schnelle initiale Anfluten des Wirkstoffes im Blut.

Wird der Wirkstoff mittels des Advanced Loading Verfahrens in die Liposomen eingeschlossen, können sich Aggregate bilden, da ein anionisch geladener Wirkstoff mit den kationischen geladenen Liposomen wechselwirkt. In dieser Ausführungsform der Erfindung wird der aussen an der liposomalen Membran anhaftende Wirkstoff durch eine Erhöhung der Ionenstärke von der Lipidmembran abgelöst, wodurch sich eine stabile Suspension bildet, welche steril filtriert werden kann.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden pH-sensitiv kationische Lipide eingesetzt, wie sie in WO 02 066490 und US 5965434 beispielhaft offenbart sind. Solche Liposomen können durch pH-Wechsel in einen anderen Ladungszustand gebracht werden und

ermöglichen so die einfache Abtrennung von aussen anhaftendem Wirkstoff. Beispiele für pH-sensitiv kationische Verbindungen sind:

Histaminyl-Cholesterolemehisuccinat (His-Chol),
Morpholin-N-ethylamino-cholesterolemehisuccinat (Mo-Chol).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird der an der liposomalen Membran anhaftende Wirkstoff nicht von der Membran abgelöst, d.h. der pH-Wert oder die Ionenstärke werden nicht verändert. Der Vorteil dieser Ausführung liegt in der Lyophilisierbarkeit der Suspension, da eine Freisetzung des innen eingeschlossenen Wirkstoffes während des Lyophilisationsvorganges minimiert wird, da sowohl auf der Innen- wie auf der Außenseite der Membran die gleich Wirkstoffkonzentration vorliegt.

Leuprolidacetat ([D-Leu⁶Pro⁹Des-Gly¹⁰]-LHRH Ethylamid) ist ein synthetisch hergestellter Agonist des LHRH (luteneizing hormone releasing hormone) und wird klinisch vor allem bei Prostatakrebs, Endometriose und vorzeitiger Pubertät eingesetzt, um den Androgenspiegel im Serum zu senken. Die kontinuierliche Gabe von Leuprolidacetat führt zunächst zu einer Erhöhung des Testosteronspiegels, bevor dieser dann bis auf das Kastrationsniveau gesenkt wird. Der initiale Anstieg des Testosterons ist zurückzuführen auf eine Stimulation der LHRH Rezeptoren in der Hypophyse und der dadurch ausgelösten Ausschüttung von LH, welches wiederum die Testosteronproduktion im Hoden stimuliert. Nach der anfänglichen Stimulation durch Leuprolidacetat kommt es schließlich zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren in der Hypophyse, wodurch die Ausschüttung von LH inhibiert wird. Dies führt dann zu einer Absenkung des Testosteronspiegels.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung wird Leuprolidacetat als Wirkstoff eines erfindungsgemäßen Depotsystems verwendet.

In weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Antigene und Antigenfragmente als Wirkstoffe eines erfindungsgemäßen Depotsystems zur Vakzinierung verwendet.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert, ohne auf diese Ausführungen begrenzt zu sein.

Beispiele

Beispiel 1

Einschluss von Alkalischer Phosphatase (AP) in Liposomen

Ein Lipidmischung folgender Zusammensetzung:

| Formulierung | Zusammensetzung |
|--------------|------------------------------------|
| AP-1 | DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (mol%) |

wird bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel AP-Lösung (from bovine intestinal mucosa) (5 mg/ml AP in 10mM HEPES, 300 mM Sucrose, pH 7,5) versetzt, dass eine 50mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen 3 Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200nm oder 400nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird die Ionenstärke der erhaltenen Suspension durch Zugabe einer NaCl-Stammlösung erhöht.

Der Anteil der eingeschlossenen Alkalischen Phosphatase wird nach Abtrennung der frei vorliegenden Alkalischen Phosphatase durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min ermittelt. Dazu wird eine Proteinfällung mit CHCl₃ und CH₃OH durchgeführt (BCA Protein Assay Reagent Kit, Perbio). Darüberhinaus wird die Aktivität der AP mittels eines Enzymassays (p-Nitrophenylphosphat Test) bestimmt. Es ergeben sich Einschlussraten von 40-50 % AP.

Beispiel 2**Einschluss von Leuprolidacetat in Liposomen**

Ein Lipidmischung folgender Zusammensetzung:

5

| Formulierung | Zusammensetzung |
|--------------|--------------------------------------|
| L1 | DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (mol%) |

wird bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel Leuprolidacetat-Lösung (2,5 mg/ml in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 6) versetzt, dass eine 100 mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen weitere 3 Einfrier- und Auftauprozesse.

15 Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 400 nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite 400 nm).

Der Anteil des eingeschlossenen Leuprolidacetats wird nach Abtrennung des frei vorliegenden Leuprolidacetats durch dreimalige
20 Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min ermittelt. Nach Extraktion mit CHCl₃ und CH₃OH wird Leuprolidacetat mittels RP-HPLC bestimmt. Es ergeben sich Einschlussraten von ca.
15 % Leuprolidacetat.

25

Beispiel 3**Einsatz von liposomalen Depotsystemen im Tiermodell**

Die Liposomen nach Beispiel 2 wurden ohne Abtrennung des aussen
5 vorliegenden Wirkstoffes in einem Volumen von 0,5mL subkutan in
gesunde männliche Ratten (3 Tiere pro Gruppe) injiziert. Die
Leuprolidacetat-Dosis pro Tier betrug 2,5 mg. Die
pharmakokinetischen Daten wurden erhalten durch Blutabnahmen zu
verschiedenen Zeitpunkten, das Gewinnen von Serum und die Bestimmung
10 der Leuprolidacetatkonzentration im Serum mittels ELISA (Peninsula).
Die gesamte Versuchsdauer der Tierstudie betrug 6 Wochen. Das
Allgemeinbefinden aller Tiere war über die Versuchsdauer gut. Die
Formulierung zeigt folgende Tabelle:

| Formulierung | Zusammensetzung | Dosis [mg] |
|--------------|---|------------|
| L1 | DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 keine Abtrennung | 2,5 |

15

20

25

30

14

Patentansprüche

1. Abgabesystem zur initialen und verzögerten
5 Wirkstofffreisetzung, dadurch gekennzeichnet, dass es Liposomen
enthaltend neutrale und kationische Lipide, sowie einen
Wirkstoff umfasst.
2. Abgabesystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die
10 Liposomen pH-sensitiv kationische Lipide umfassen.
3. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein therapeutisches Peptid
oder Protein umfasst.
- 15 4. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass Wirkstoff im Liposom eingeschlossen ist
und mehr als 10% sich außerhalb des Liposoms befindet.
- 20 5. Abgabesystem zur verzögerten Wirkstofffreisetzung nach einem
der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die
verzögerte Abgabe des Wirkstoffes mindestens 1 Woche anhält.
6. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass die Liposomen
 - aus gesättigten synthetischen Phosphatidylcholinen,
ausgewählt aus der Gruppe DMPC, DPPC und/oder DSPC,
 - aus Cholesterol,
 - die kationischen Lipide ausgewählt aus der Gruppe DC-Chol,
30 DAC-Chol und/oder DOTAP
zusammengesetzt sind.
7. Abgabesystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die
kationischen Lipide pH-sensitiv kationisch sind und ausgewählt
35 aus der Gruppe His-Chol und/oder Mo-Chol.

8. Abgabesystem nach den vorgehenden Ansprüchen 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil der kationischen Lipide zwischen 5 und 20mol% beträgt und der Anteil aller sterolbasierten Lipide zwischen 35 und 60% beträgt.

9. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Liposomen variiert von 20-1000 nm, insbesondere von 50-800 nm, bevorzugt von 50-300 nm.

10. Verfahren zur Herstellung eines liposomalen Depots mit kationischen Lipiden dadurch gekennzeichnet, dass

- Liposomen in Gegenwart einer wässrigen Wirkstofflösung hergestellt werden, wobei Lipidkonzentrationen von 50 bis 120mM, bevorzugt von 80 bis 110 mM verwendet werden,
- nichteingeschlossener Wirkstoff von den Liposomen nicht oder nur teilweise abgetrennt wird.

11. Verfahren zur Herstellung eines liposomalen Depots mit kationischen Lipiden dadurch gekennzeichnet, dass

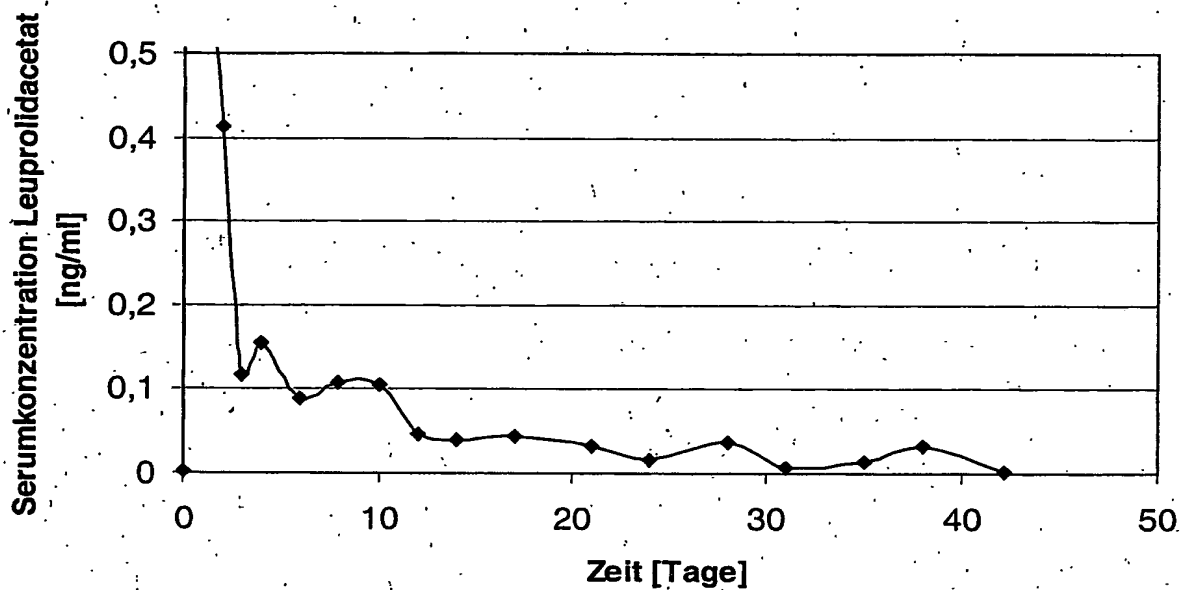
- Liposomen in Gegenwart von Wirkstoff hergestellt werden, wobei bei einem pH-Wert gearbeitet wird, bei welchem der Peptid- oder Proteinwirkstoff in einem anionischen Ladungszustand vorliegt,
- nach der Herstellung an der Aussenseite der Membran haftender Wirkstoff durch eine Veränderung des pH-Wertes oder einer Erhöhung der Ionenstärke abgelöst wird,
- nichteingeschlossener Wirkstoff von den Liposomen nicht oder nur teilweise abgetrennt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Lipidkonzentrationen von 50 bis 120 mM, bevorzugt von 80 bis 110 mM verwendet werden.

13. Verwendung des Abgabesystems nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels.

14. Verwendung des Abgabesystems nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur subkutanen oder intramuskulären Applikation.
- 5 15. Verwendung des Abgabesystems nach einem oder mehrerer der Ansprüche 1 bis 9 für ein Depot von Antigenfragmenten zur Vakzinierung.
- 10 16. Verwendung des Abgabesystems nach einem oder mehrerer der Ansprüche 1 bis 9 für ein Depot von LHRH-Agonisten oder GnRH-Analoga dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen
- aus DPPC, Cholesterol,
 - aus den kationischen Lipide DC-Chol oder DOTAP, aufgebaut sind und
 - LHRH-Agonisten oder GnRH-Analoga wie Leuprolidacetat,
- 15 Buserelin, Goserelin oder Triptorelin als Wirkstoff enthalten.
- 20 17. Verwendung eines Abgabesystems nach einem oder mehrere der Ansprüche 1 bis 9 für ein Depot von Heparin dadurch gekennzeichnet, dass die Heparin enthalten.

17



5 Abbildung 1

Liposomales Depotsystem mit Leuprolidacetat aus Beispiel 3 der vorliegenden Erfindung im Tiermodell (Serumspiegel Leuprolidacetat)

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox